

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2879063号

(45) 発行日 平成11年(1999) 4月5日

(24) 登録日 平成11年(1999) 1月29日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00 A
C 0 7 K 14/61		C 0 7 K 14/61
C 1 2 P 13/06		C 1 2 P 13/06 Z
21/02		21/02 H
// C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19

請求項の数16(全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平1-502300	(73) 特許権者	999999999 ファルマシア・アンド・アップジョン・カンパニー アメリカ合衆国ミシガン州49001、カラマズー、ヘンリエッタ・ストリート301番
(86) (22) 出願日	平成1年(1989) 2月7日	(72) 発明者	ブラナー, デイビッド・ビー アメリカ合衆国ミシガン州49002、ボーテッジ、ブルックレスト・ドライブ8245番
(65) 公表番号	特表平3-502758	(72) 発明者	ハーバー, ガリー・シイ アメリカ合衆国ミシガン州49009、カラマズー、ノース・イーグル・レイク・ドライブ1170番
(43) 公表日	平成3年(1991) 6月27日	(74) 代理人	弁理士 青山 稔 (外1名)
(86) 国際出願番号	P C T / U S 8 9 / 0 0 4 2 5	審査官	吉住 和之
(87) 国際公開番号	W O 8 9 / 0 7 6 5 1		
(87) 国際公開日	平成1年(1989) 8月24日		
審査請求日	平成8年(1996) 2月5日		
(31) 優先権主張番号	1 5 7, 2 7 5		
(32) 優先日	1988年2月17日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリペプチド類においてノルロイシン含有量を制御するための発酵培地および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 発酵培地において、メチオニンの濃度を増加させるか、またはノルロイシンの量を減少させるか、あるいは双方を行うことを特徴とする、低濃度のアミノ酸類よりなる発酵培地上で増殖させた組換え体宿主微生物によって発現される異種ポリペプチドへのノルロイシン取り込みを減少させる方法。

【請求項2】 メチオニン生成酵素類について抑制され、かつメチオニンを過剰生産する突然変異体微生物を利用することを特徴とする低濃度のアミノ酸類上で増殖させた組換え体宿主微生物によって発現される異種ポリペプチドへのノルロイシン取り込みを阻止する方法。

【請求項3】 低濃度のアミノ酸類を有する発酵培地上で組換え体宿主微生物を増殖させつつ当該ポリペプチドを過剰発現させることを特徴とする該微生物によって発現さ

れる異種ポリペプチドへのノルロイシン取り込みを引き起こす方法。

【請求項4】 異種ポリペプチドをコード付けする組換え体DNA分子におけるメチオニンをコード付けするコドン類をそれらが異なるアミノ酸をコード付けするように変化させることを特徴とする、該ポリペプチドをコード付けする該DNA分子で形質転換され、かつ低濃度のアミノ酸類上で増殖させた該微生物によって発現される該ポリペプチドへのノルロイシン取り込みを阻止する方法。

【請求項5】 該培地をメチオニンまたはロイシンあるいはその双方で補足することよりなる請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項6】 該培地をシステインで補足することよりなる請求の範囲第1項記載の方法。

【請求項7】 該異なるアミノ酸の少なくとも1つがイソ

ロイシン、ロイシンおよびバリンから選択される請求の範囲第4項記載の方法。

【請求項8】該異なるアミノ酸の少なくとも1つがイソロイシンである請求の範囲第7項記載の方法。

【請求項9】該組換体宿主微生物がバチラス (*Bacillus*)、サッカロミセス (*Saccharomyces*)、ストレプトミセス (*Streptomyces*)、およびエシェリヒア・コリ (*E. coli*) 株から選択される請求の範囲前記いずれか1項に記載の方法。

【請求項10】該組換体微生物がエシェリヒア・コリである請求の範囲第9項記載の方法。

【請求項11】該異種ポリペプチドがソマトトロピンである請求の範囲前記いずれか1項に記載の方法。

【請求項12】該ソマトトロピンがウシ・ソマトトロピンである請求の範囲第11項記載の方法。

【請求項13】低濃度のアミノ酸類を有する発酵培地上でエシェリヒア・コリを増殖させ、次いで、該エシェリヒア・コリによって生産されたノルロイシンを単離することを特徴とするノルロイシンの生産方法。

【請求項14】少なくとも1つのメチオニン残基が少なくとも1つの異なるアミノ酸によって置き換えられたウシ・ソマトトロピン。

【請求項15】該少なくとも1つの異なるアミノ酸がイソロイシン、ロイシンおよびバリンから選択される請求の範囲第14項記載のウシ・ソマトトロピン。

【請求項16】該少なくとも1つの異なるアミノ酸がイソロイシンである請求の範囲第14項記載のウシ・ソマトトロピン。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は生化学エンジニアリングの分野に属する。さらに詳しくは、本発明はポリペプチド類を生産するための発酵方法およびそれにより生産されたポリペプチド類に関する。

発明の背景

微生物類を培養するための合成培地されかつ化学的にははっきりとした培地はよく知られている。細菌を培養するための通常の栄養培地は異種ポリペプチド類を生産できる組換体細菌を増殖させるのに使用されてきた。酵母エキスのごときアミノ酸源およびカザミノ酸源は、通常、発酵期間を通じて発酵培地に高濃度で含まれる。かかるアミノ酸は高価である。従って、同時に良質の望ましいポリペプチド類の発現を高レベルに維持しつつ、発酵培地において補足アミノ酸の量を減少させることは有用であろう。

情報の開示

ノルロイシンは微生物代謝におけるメチオニンの類似体として作用することは公知である。外因性ノルロイシンを供給することによるメチオニン利用の競合的抑制によってイー・コリ (*E. coli*) 増殖が妨げられたことが報

告されている (ジェイ・ハリスおよびエイチ・アイ・コーン (J.S.Harris and H.I.Kohn)、ジャーナル・オブ・ファルマコロジー (*J.Pharmacol.*)、73,383~400頁 (1941))。ノルロイシン補足が最適濃度のメチオニンを含む培地におけるイー・コリのメチオニン要求株の増殖を増大させたことも観察されている (ジェイ・オー・ランペンおよびエム・ジェイ・ジョーンズ (J.O.Lampen, and M.J.Jones)、アーカイブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (*Arch.Biochem.Biophys.*)、13,47~53頁 (1947))。しかしながら、ノルロイシンの生物学的役割を調べる研究は外因性アミノ酸源として供給されたノルロイシンを使用してきたに過ぎない。

アール・ムニエおよびジイ・エヌ・コーヘン [R.Munier and G.N.Cohen)、ビオシミカ・エ・ビオフィジカ・アクタ (*Biochim.Biophys.Acta.*)、31,378~90頁 (1959)] は、外因的に供給したノルロイシンはメチオニンの代わりに細菌蛋白に *in vivo* にて取り込まれ得ることを示した。イー・コリ蛋白合成におけるメチオニンの代わりとしてのノルロイシンの運命についての詳細な研究は、ノルロイシンがイー・コリ蛋白類に取り込まれる能力を支持する (デイ・ジイ・バーカーおよびシイ・ジェイ・ブルトン (D.G.Barker and C.J.Bruton)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (*J.Mol.Biol.*)、133,217~31頁 (1979))。ノルロイシンは *in vitro* および *in vivo* 双方において $tRNA^{Met}$ および $tRNA^{fMet}$ をチャージ (charge) し得ることが示されている。ノルロイシンはアミノアシル・アデニレート・コンプレックスを形成し、メチオニル- $tRNA$ シンテターゼの存在下で PP_i を放出する (ATP-PP_i 交換反応) ことが示されている (ビー・ニスマンおよびエム・エル・ヒルシュ (B.Nisman and M.L.Hirsch)、アヌ・インスト・パスツール (*Ann.Inst.Pasteur*)、95,615~34頁 (1958)) ; ジェイ・エム・オールドおよびデイ・エス・ジョーンズ (J.M.Old and D.S.Jones)、バイオケミカル・ジャーナル (*Biochem.J.*)、165,367~73頁 (1977))。また、ノルロイシンはイー・コリ $tRNA^{Met}$ のアシル化においてメチオニンと置き換わることも示されている (ジェイ・トルピンら (J.Trupin et al)、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (*Biochem.Biophys.ResCommun.*)、24,50~55頁 (1966)) ; エイ・アール・フェルシュトおよびシイ・ディンクウォール (A.R.Fersht and C.Dingwall)、バイオケミストリー (*Biochem.*)、18,1250~56頁 (1966))。加えて、ノルロイシル- $tRNA^{fMet}$ はホルミノルロイシル- $tRNA^{fMet}$ へ容易にホルミル化され、蛋白合成を開始するのにホルミルメチオニル- $tRNA^{fMet}$ に置き換えることができる (エス・エス・ケルバーおよびエイチ・ワイスバック (S.S.Kerwar and H.Weissbach)、アーカイブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (*Arch.B*

iochem. Biophys.) ,141,525-32頁 (1970))。また、メチオニンが枯渇してノルロイシンが供給された場合に、(ほとんど絶対的にノルロイシンで) チャージされたtRNA^{Met} 合計パーセンテージは、合計tRNA^{Met} の<50% であることも示されている (バーカーおよびブルトン (Barker and Bruton) 、前掲)。ノルロイシンによる増殖の抑制が報告されている (アール・ムニエおよびジイ・エヌ・コーヘン (R. Munier and G. N. Cohen) 、前掲; エス・エス・ケルバーおよびエイチ・ワイスバック (S. S. Kerwar and H. Weissbach) 、前掲; バーカーおよびブルトン、前掲)。

従って、外因的に供給されたノルロイシンに関する *in vivo* および *in vitro* 実験を通じて、ノルロイシンはメチオニン類似体として作用することが長い間知られている一方、本発明者らは、イー・コリ培養によるノルロイシンの合成に関するいずれの報告も知らない。初期の報告はノルロイシンおよび構造的に類縁の化合物ノルバリンの天然の存在を引用していた。ノルロイシンは動物神経組織中 (イー・アブデルハルデンおよびケイ・ヘインズ (E. Abderhalden and K. Heyns) 、ツビシュル・フィジオル・ケム (Zwischr. Physiol. Chem.) ,214,262~66 頁 (1933)) で、およびトウゴマ (*Ricinus communis*) 種子類の成分 (アール・ヌッコリニ (R. Nuccorini) 、アヌ・シム・アプル (Ann. Chim. Appl.) ,24,25-32 頁 (1934)) として見い出されており、一方、ノルバリンはバチラス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) によって合成された抗菌類蛋白の成分であると報告されている (ピー・ナンディおよびジイ・ピー・セン (P. Nandi and G. P. Sen) 、ネイチャー (Natuere) ,171,871~72 頁 (1953))。

セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*) のコンプレックス調節突然変異体によるノルロイシンの形成が報告されている (エム・キスミラ (M. Kisumi et al) 、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.) ,80,333~39 頁 (1976) ; エム・キスミラ (M. Kisumi et al) 、アプライド・アンド・バイアロンメンタル・マイクロバイオロジー (Appl. Environ. Microbiol.) ,34,135~38 頁 (1977))。ロイシン生成酵素について抑制解除されたエス・マルセセンス (*S. marcescens*) が選択され、スレオニンデヒドラターゼを欠くイソロイシン-依存性突然変異体をさらに選択するのに用いられた。この二重突然変異体から、フィードバック耐性 α -イソプロピルマレートシンターゼを含有するイソロイシン-非依存性 (スレオニン-デヒドラターゼ欠損) 突然変異体が選択された。この最終複合突然変異体はノルロイシンを蓄積した。

発明の要約

本発明は、一般に、発酵培地において、メチオニン濃度を増加させるか、またはノルロイシンの量を減少させるか、あるいは双方を行うことを特徴とする低濃度のア

ミノよりなる発酵培地上で増殖させた微生物によって発現されるポリペプチド類へのノルロイシンの取り込みを減少させる方法に関する。

さらに詳しくは、本発明は、メチオニン源、システイン源、またはロイシン源、あるいはその組み合わせの源を培地に補足することを特徴とする低濃度のアミノ酸を有するはっきりとした発酵培地上で増殖させた微生物によって発現されるポリペプチド類へのノルロイシン取り込みを減少させる方法に関する。ノルロイシン取り込みはメチオニンまたはロイシン補足によって妨げることができる。

さらに詳しくは、該微生物は組換体微生物であり、かく発現されるポリペプチドは異種ポリペプチドである。

また、本発明は、低濃度のアミノ酸を有し、かつメチオニン源、システイン源、またはロイシン源、あるいはその組み合わせ源を補足した発酵培地に関する。

また、本発明は、メチオニンを過剰生産できる突然変異体微生物を利用することを特徴とする微生物によって発現されるポリペプチド類へのノルロイシン取り込みを阻止する方法に関する。

また、本発明は、低濃度のアミノ酸を有し、かつ蛋白の過剰発現が可能であるはっきりとした発酵培地上で微生物を増殖させることを特徴とする該微生物によって発現されたポリペプチド類へのノルロイシンを取り込む方法に関する。

また、本発明は、低濃度のアミノ酸を有し、かつノルロイシンを補足したはっきりとした発酵培地上で微生物を増殖させることを特徴とする該微生物によって発現されたポリペプチドへのノルロイシンを取り込む方法に関する。

また、低濃度のアミノ酸を有する発酵培地上でエシェリヒア・コリ (*E. coli*) を増殖させ、次いで、かく生産されたノルロイシンを単離することを特徴とするノルロイシンの生産方法を提供する。

また、アミノ酸残基 5、124、149 および 179 に位置するメチオニンが特にロイシン、バリンまたはイソロイシンよりなる群から選択される異なるアミノ酸残基で置き換えられたことを特徴とする bSt 様化合物類を提供する。

また、本発明は、ポリペプチドをコード付けする組換体 DNA 分子中のメチオニンをコード付けするコドンと異なるアミノ酸、例えばイソロイシンをコード付けするものに変化させることを特徴とする、該ポリペプチドをコード付けする該 DNA 分子で形質転換し、かつ低濃度のアミノ酸上で増殖させた微生物類によって発現された異種ポリペプチド類、例えばウシ・ソマトトロピンへのノルロイシンの取り込みを阻止する方法に関する。

発明の詳細な記載

本明細書中で用いるごとく、「異種ポリペプチド (類)」とは、注目する形質転換宿主微生物によって天

然には合成されないポリペプチド類をいう。例えば、イー・コリはウシおよびヒト・ソマトトロピン・インシュリン、インターフェロン等を生産することができる。かく生産されたポリペプチド類は「異種ポリペプチド類」と呼ばれる。本発明において特に注目すべきは、メチオニンよりなる異種ポリペプチド類である。

ソマトトロピン類の分子不均質性のため、種々のソマトトロピン類のアミノ酸残基類の位置番号は異なり得る。「天然哺乳動物ソマトトロピン」なる語は天然に生じる種を包含する。チャート1は、本発明により修飾された位置5、124、149、および179残基に対応するbStの特異的アミノ酸残基を示す。他のソマトトロピン類についての番号付けは、他の種または類似体類に関する場合は異なり得る。当業者ならば、チャート1に記載したbStのメチオニン5、124、149または179を用い、別の動物ソマトトロピン類、例えば哺乳動物ソマトトロピン類における対応するアミノ酸類、例えばブタ・ソマトトロピンまたはその類似体のメチオニン5を容易に位置決めして、ノルロイシン取り込みの所望の回避を達成したり、本発明の均一性を生じさせたりできる。

本明細書中で用いるごとく、「低濃度のアミノ酸類」は、その上で培養される微生物によって、アミノ酸生合成酵素類（例えば、ロイシン生合成酵素類）の生合成を抑制したり、または当該酵素類の活性を効果的にフィードバック抑制するには余りにも低過ぎる外因性アミノ酸濃度と定義される「最小濃度のアミノ酸」まで低下され得るのに十分低い濃度を意味する。特に定義がない限り、「低濃度のアミノ酸類」は、その上で培養される微生物によって、メチオニール-tRNAの正常なチャージングにつき、メチオニンについての K_m より十分低く、かくしてノルロイシンでのメチオニール-tRNAの不正確なチャージングが可能となる「最小濃度のアミノ酸類」まで減少され得る濃度を意味する。「低濃度のアミノ酸類」の「最小濃度のアミノ酸類」へのかかる減少は、所望の蛋白のメチオニンの代わりにノルロイシンの検出可能な取り込みを含むようなときに起こる。

本明細書中で用いるごとく、「高濃度のアミノ酸類」は、「低濃度のアミノ酸類」が過剰状態にあって、所望の蛋白の発現の誘導に先立ち、誘導の時に、または誘導後まもなく「最小濃度のアミノ酸類」まで減少され得ない濃度のアミノ酸類である。例えば、特別の実施例のイー・コリ宿主類およびrbStポリペプチドに関しては、「低濃度のアミノ酸類」は各々約0.50mM未満であり、0.1%酵母エキスを補足から得られる。「低濃度のアミノ酸類」は、各々約0.05mM満である「最小濃度のアミノ酸類」まで低下される。かかるアミノ酸濃度は、特別の実施例のごとき方法に従う定量的なアミノ酸分析によって、与えられたいずれの宿主、与えられたいずれのポリペプチドについてのいずれの発酵に関しても容易に決定される。

本発明で用いる組換体宿主微生物類は、当業者によく知られ、例えば、ここに参照のために挙げる、分子クローニング (Molecular Cloning)、テイ・マニアティスら (T. Maniatis, et al)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982) およびビー・ペルバル (B. Perbal)、分子クローニングへの実用的ガイド (A Practical Guide to Molecular Cloning)、ジョン・ウィリー・アンド・サンズ (John Wiley & Sons) (1984) に記載されたDNA組換え技術によって作製される。有用な宿主微生物類は異種遺伝子類をクローニングしそれを発現するのに適するよく知られたいずれの宿主類も包含し、例えば、バチラス (Bacillus)、サッカロミセス (Saccharomyces) およびストレプトミセス (Streptomyces) 株を包含する。

異種ポリペプチドを生産する組換体微生物類は液体栄養培地中で培養する。該培地は微生物の細胞増殖要件を満足し、それにより、微生物が増殖し所定の細胞密度まで増加できる、過剰の通常の栄養物質よりなる。この物質は炭素源、窒素源および硫黄、リン、マグネシウム、カリウム、銅、亜鉛、マンガンおよび鉄のごときミネラル類を包含する。アミノ酸類は、カゼイン、大豆ミール、ラクトアルブミン、動物組織、酵母細胞およびゼラチンのごとき天然に生じる蛋白様物質を酸または酵素消化に付すことによって通常製造される蛋白加水分解物の形態で添加することができる。純粋なアミノ酸類の混合物類も添加することができる。本発明者らは、ノルロイシンの生合成および発現されたポリペプチドへ類の取り込みが、低濃度のアミノ酸類を補正せずまたは補正したいずれかの最小培地（例えば、はっきりとした無機塩および炭素源、例えばグルコースまたはグリセロール）よりなり、かつその中で蛋白の過剰発現が起こる発酵培地中で起こることを見出した。また、酸素も該培地に供給する。最大細胞密度を達成するには、培養は、通常、酸素/液体の界面領域を増すように行う。

培養に影響する重要な環境因子はpHおよび温度を含む。温度は最小および最大増殖温度の間の範囲とする。ほとんどの細菌はかなり狭い温度範囲にわたり最大増殖を示す。イー・コリのごとき中温菌については、最適温度範囲は約25℃ないし約42℃、好ましくは約37℃である。ほとんどの生物類はpH数単位にわたる範囲の水素イオン濃度に耐える。イー・コリのごとき細菌については、許容pHは約6ないし8の範囲にあり、約6.8が好ましい。

異種ポリペプチドをコード付けする遺伝子の発現が抑制可能な発現制御配列の制御下にある場合、適当なリプレッサーを培地に添加することによる（例えば、発現がトリプトファンプロモーターおよびオペレーターの制御下にある場合はトリプトファン）によって、その遺伝子の発現を所定レベルの増殖が細胞培養により達成される

まで抑制することができる。

収穫の後、細胞類を加工して異種ポリペプチドを回収する。これは、通常、細胞の破壊、1またはそれ以上の抽出工程による粗製異種ポリペプチドの細菌蛋白類からの分離、(その疎水性に依存する)当該ポリペプチドの可溶化、適当な場合には、適当なジスルフィド結合を生成させるためのスルフヒドリルの酸化、およびさらにゲル濾過、高速液体クロマトグラフィーまたは他の蛋白精製手法によるポリペプチドの精製を含む。

本発明者らは、微生物類におけるポリペプチド類、特に組換体宿主類における適当なアミノ酸配列を有する

(例えば、メチオニンに代えて置き換えたノルロイシン無し)異種ポリペプチド類の過剰発現を効果的に支持する低濃度のアミノ酸よりなる発酵培地をかなり低減化した価格で作製した。これは重要である。というのは、生産物の精製において付随した節約を伴う同種生産物類の生産が可能になるからである。また、シアノーゲンプロマイドによって切断できるメチオニン残基により結合した異種ポリペプチド類の発現が容易となる。

他方、メチオニンの代わりに置き換えたノルロイシンを有するポリペプチド類を生産するのも望ましいであろう。メチオニン残基のノルロイシンでの意図した置換により、(メチオニンスルホンまたはスルホキッドへの)酸化に対する大きな耐性およびメチオニン特異的のプロテアーゼ類または修飾剤類に対する耐性を具備した蛋白の合成が可能となる。

本発明者らは、組換体微生物類によって異種ポリペプチド類を生産するために、例えばエシェリヒア・コリK-12株において組換えにより生産されるウシ・ソマトトロピン(rbSt)を生産するために発酵を行ってきた。これらの発酵は、比較的高濃度の酵母エキス(例えば、5重量/容量%までの酵母エキス)を補足したはっきりとした培地でまず開始した。比較的高濃度の酵母エキスを使用した結果、これらの最初の発酵は「高酵母エキス」発酵と名付けた。しかしながら、特に生産規模における高価格の酵母エキス補足は、これらの発酵を経済的に不可能なものとした。従って、本発明者らは、 $\leq 0.5\%$ 酵母エキスで補足することによって「低酵母エキス」発酵培地およびプロセスを開発した。

低酵母エキス発酵培地を用いた場合、(合計rbStの30%までの量の)主要異常rbSt種が、単離したrbStロットの逆相高圧液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)分析に際して見い出された。かかる異常rbSt種は高酵母エキス発酵の間に生産されたロットでは検出されなかった。よって、新しく遭遇したrbSt種の生産は価格的に有効な低酵母エキス発酵の使用に直接帰すべきものであった。

該異常rbSt種はRP-HPLCクロマトグラムでは正常なrbStよりも遅く溶出することが判明し、遅延溶出rbSt(LE-rbSt)と呼ぶ。LE-rbStを単離し、広範な構造分析を行った。構造データにより、LE-rbStはrbSt分子中のア

ミノ酸番号124におけるメチオニンに代えるノルロイシンの置換の結果として低酵母エキス発酵の間に産生されることが確立された。さらに、他の内部のメチオニン位置、5、149および179位におけるノルロイシン置換も検出されたが、RP-HPLCに際してのrbStのクロマトグラフィー挙動の変化の直接原因ではないようである。

低酵母エキス発酵の間のノルロイシンのrbStへの取り込みは予期せぬことであって、ノルロイシンの源は分らなかった。さらに、低酵母エキス発酵プロトコルの結果、何故ノルロイシンの取り込みが起こるか分らなかった。本発明に先立っては、ノルロイシンのrbStへの取り込みを排除する公知手段はなかった。この問題を解決するために、本発明者らは、発酵培地にL-メチオニンを補足し、それにより、ノルロイシンの取り込みを完全に排除した。外因性L-ロイシンによる α -イソプロピルマレートシンターゼ(LeuA⁺)のフィードバック抑制もまたノルロイシンの生合成および蓄積、かくしてノルロイシンのrbStへの取り込みを完全に排除した。与えられた宿主および所望のポリペプチドについてのノルロイシン取り込みを排除するために添加されるべきメチオニンおよびロイシンの量は実施例に記載した方法によって容易に決定できる。また、システインでの補足もノルロイシンのrbStへの取り込み量を減少させた。

天然のrbStは第5位にメチオニン残基を有する。他のメチオニン残基に関し、第5位メチオニンもノルロイシン残基によって置き換えられ得る。理論に拘束されるつもりはないが、通常メチオニン残基によって占められる位置におけるノルロイシンの取り込みは、ノルロイシンでのメチオニル-tRNAのチャージング(charging)および引き続いてのチャージされたtRNA分子とメチオニンコドンとの相互作用の直接の結果のようである。従って、メチオニン以外のアミノ酸についてのコドンでのメチオニンコドンの置き換えは、rbStまたはかかるメチオニン残基を有する他の異種ポリペプチド類へのノルロイシンの取り込みを妨げるであろう。

細菌の培養：イー・コリ株BST-1を用いた。この株は、ラムダプロファージおよびFプラスミドの除去ならびにropH112対立遺伝子の導入によってイー・コリK-12(ATCCe23716)の野生型株から得られた。次いで、プラスミドpURA4、プラスミドpBEU-17およびpBR322に由来し、かつrbStの生産をコード付けする遺伝子を含有する温度感受性ランナウェイ複製プラスミドでこの株を形質転換した(1987年2月19日出願の米国特許出願S.N.016294号およびPCT特許出願、PCT/US88/00328をここに参照のために挙げる)。

培養培地：はっきりとした培地はエイチ・ジェイ・ボーゲルおよびデイ・エム・ボネル(H.J.Vogel and D.M.Bonner)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、218,97~106頁(1955)の培地Eに基づくものであった。初代種および発酵培地を調製

するための組成およびプロトコルは以下の通りである。

初代種培地

成分	1 当たりの量
Na (NH ₄) HPO ₄ · H ₂ O	10.90g
K ₂ HPO ₄	2.61g
クエン酸 · H ₂ O	2.10g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.99g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.66g
酵母エキス	10.40g
グリセロール	5.00g
逆浸透水	

初代種培養については、前記成分を水（逆浸透グレード、R.O.）で水和し適量にて1000mlとし、滅菌に先立って300ml容量に分割した。種培地を121℃で20分間滅菌した。滅菌に続き、該種培地を冷却し、0.5ml滅菌アンピシリン（NaOHでpH8.0に滴定し、濾過滅菌（0.45 μm）した逆浸透水中25g/l）を添加した。

発酵培地

成分	1 当たりの量
Na (NH ₄) HPO ₄ · H ₂ O	10.90g
K ₂ HPO ₄	2.61g
クエン酸（無水物）	1.92g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.66g
酵母エキス	1.00g
SAC4130	0.75ml
逆浸透水	

発酵培地は、前記量の成分を200倍とし、それらを250リットルのファーマンターにて逆浸透水165リットル中で水和させることによって調製した。次いで、発酵培地を121℃で20分間滅菌した（滅菌の間、水蒸気凝縮のため、20リットルの培地容量の水増しを採用した）。滅菌に続き、培地のpHをチェックして6.6ないし6.9であることを確認した。冷却に際し、2種の無菌添加を行い、発酵培地を完成させた。第1の添加は、予め濾過（0.45 μm）によって滅菌した微量養分200ml分（終濃度：(NH₄)₆ (MO₇)₂₄ · 4H₂O、12 μM；H₃ BO₃、1.6 mM；CoCl₂ · 6H₂O、120 μM；CuSO₄、39.9 μM；MnCl₂ · 4H₂O、319 μM；ZnSO₄ · 7H₂O、40.1 μM）よりなるものであった。第2の添加は、セロース（celulose）15リットル（8.24kgセロースを逆浸透水適量にて14リットルとし、H₂ SO₄でpH 4.0に調製）よりなるものであった。発酵培地は接種に先立って25% NaOHでpH7.2に調整した。

低酵母エキス発酵培地はBST-1培養用の0.1%酵母エキスを含有していた。いくつかの実験において、カザミノ酸類、L-メチオニン、L-ロイシン、D,L-ノルロイシン、食料または飼料グレードのD,L-メチオニンまたはL-システイン源を発酵培地に添加した。

プラスミドコピー数アッセイ：発酵の間に周期的に得られた培養試料について粗製プラスミドコピー数アッセ

イを行った。かかる試料からの約2x10¹⁰ 細菌を含有するペレットを再懸濁緩衝液（90mM トリス、90mM ホウ酸塩、60mM EDTA、25%スクロース）150 μlに再懸濁した。リゾチウムを添加し（10mg/mlの30 μl）、懸濁液を37℃で10分間インキュベートし、しかる後、リボヌクレアーゼA（20mg/ml、80℃で10分間予熱）30 μlを添加した。37℃での10分後、プロテイナーゼK（1mg/ml）30 μlを添加し、さらに20分間インキュベーションを継続した。次いで、混合物を15分間で65℃にシフトした。溶解混合物（90mM トリス、90mM ホウ酸塩、60mM EDTA、1.25%（v/v）トリトンX-100）210 μlを添加し、それらを氷上で10ないし20分間インキュベートすることによって細胞を溶解した。溶解物をマイクロ遠心機中、4℃で40分間遠心した。清澄化した溶解物を透明な1.5mlマイクロ遠心機遠心管に注ぎ、-20℃で保存した。90mM トリス、90mM ホウ酸塩、2.5mM EDTA緩衝液中で調製した0.8%アガロースゲルにて、1ないし5ボルト/cmでの電気泳動によって含プラスミド溶解物を典型的な分析に付した。実施例1 低酵母エキス発酵培地の使用によるノルロイシン置換rbStの生産

発酵プロトコル：各初代種培養を1の培養アンブル（約1ml）の内容物で接種し、28℃でインキュベートして0.7ないし0.8A₅₅₀の培養密度とした。インキュベーションに続き、ファーマンターの接種に使用するに先立って、各初代種培養を氷上に乗せた。すべての初代種培養をアンピシリンで補足して実質的にすべてのプラスミド担持細菌を含有する培養を得た。600ml接種物での接種によってBST-1発酵を開始した。ファーマンターのpHを無水アンモニアで制御してpHを7.2ないし7.4に維持した。ファーマンターの攪拌およびエアレーション速度を、10psiの逆圧にて、320rpmおよび300slmに設定した。27℃の許容温度で培養増殖を行った。プラスミドランナウェイ複製およびrbSt合成は自然に誘導されるので、BST-1発酵を開始27℃に維持した。

分析手法：培養の一部を種々の時点に初代種およびファーマンターから取り出し、一連の分析手法に付して培養密度（550nmにおける吸光度）、合計細菌乾燥重量、合計rbSt濃度、グルコース濃度、遊離アンモニア濃度、アセテート濃度を定量し、および鏡検同定および封入体の定量を行った。

RP-HPLC用試料調製：rbSt分析調製物を用いて蛋白のRP-HPLC単離用に試料を調製した。発酵培養の10A₅₅₀ · ml部を遠心によって収穫し、上澄みを除去した。次いで、細胞ペレットを、15mg/mlデチオスレイトールを含有する6Mグアニジン塩酸塩650 μlに再懸濁し、5分間沸騰した。試料を冷却した後、イソプロパノール350 μlを添加した。

rbStのRP-HPLC単離：Varian Vista5500液体クロマトグラフにて、4.6x100mmのBekerbond-Widepore C-8カラムでRP-HPLCを行った。グラジエント移動相は各々が

0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含有する水-イソプロパノールであった。流速は1ml/分であった。グラジエントは11分内で35ないし54%Bとした。検出は215nmにおけるUVによった。試料の一部500 μ lをインジェクトし、rbSt画分をスクリーキャップのマイクロ遠心機遠心管中に収集した。これらの試料を凍結乾燥し、4℃で保存した。これらの試料は1ないし3ナノモルの蛋白を含有していた。

ポリペプチドの配列決定:N-末端アミノ酸配列決定分析はオンラインABI 120A PTHアナライザーを装備したアプライド・バイオシステム (Applied Biosystems) (ABI) 470Aシーケンサーで行った。まず、カートリッジフィルターを1.5mgポリブレン (polybrene) で調製し、ABIプログラム03PREを用いてプレサイクルさせた。試料を0.1%TFA60 μ lに溶解し、30 μ l分にて該フィルターに負荷した。該フィルターを適用と適用の間にカートリッジオープン中で乾燥した。各試料につき、該ABIプログラム03PTHを少なくとも5サイクル用いた。ノルロイシン+メチオニンの合計ピコモル数で除することによって、第5サイクルにおけるノルロイシンパーセントをノルロイシンのピコモル数として計算した。最初の収量は3.9ナノモルから73ピコモルまで変動した。キャリア無しで平均収率91.2%、キャリアを用いた場合は92.7%であった。

アミノ酸分析:低酵母エキス発酵中に起こるアミノ酸フラックスを調べるために、培地試料を発酵間に周期的に得、アミノ酸分析に付した。アミノ酸分析は、実質的にビー・エイ・ビドリグメイヤーら (B.A.Bidligmeyer et al), ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (J.Chromatogr.), 336,93-104頁 (1984) に記載されているごとくPTC法 (アール・エル・ヘインリクソンおよびエス・シイ・メリデス (R.L.Heinrikson and S.C.Meredith), アナリティカル・バイオケミストリー (Anal.Biochem.), 136,65-74頁 (1984)) によって行った。

発酵培地試料は各BST-1でのrbSt発酵から得、アミノ酸分析に付した。株BST-1での低酵母エキス発酵は0.1%酵母エキスを含有していた。第1表に示すデータは、株BST-1での典型的な低酵母エキス発酵について、アミノ酸は0.04mM (ヒスチジン) ないし0.38mM (ロイシン) の範囲の初期濃度で存在し、実質的にすべてのアミノ酸がrbSt合成の自然誘導に先立って (接種後約15時間) 消費されたことを示す。事実、ほとんどのアミノ酸は接種後約16時間までに消費された。アラニンおよびグルタミン酸は0.04mM (接種後15時間) および0.03mM (接種後17時間後) に達し、各々、0.88mMおよび1.65mMの終濃度まで増加した。従って、これらのデータは、ほとんどのアミノ酸がrbSt合成の自然誘導のほぼ9時間先立って培地から枯渇したことを示す。さらに、それらは、培養増殖およびrbSt合成に要するアミノ酸はde nov

o合成されるべきだったことを示す。

第2表のデータは、培地中のノルロイシン蓄積とrbStにおけるノルロイシンの取り込みとの間の関係を示す。接種後19時間まで (誘導後約4時間)、ノルロイシンは培地中に検出されず、一方、N-末端アミノ酸配列決定により、rbSt5位にすでに2.6モル%のノルロイシンが存在することが明らかとされた (第2表)。接種後25および33.5時間 (誘導後約10および18.5時間) に得た発酵試料は、培地中でのノルロイシンの濃度の増加およびrbStのN-末端および5位に取り込まれたノルロイシン画分 (モル%) の対応しての増加を示した (第2表)。これらの結果は、異なるイー・コリ宿主培養で確認された。実施例2 株BST-1での低酵母エキスの発酵間のノルロイシンの合成および分泌

ノルロイシンがイー・コリ培養によって合成されたことを証明するために、低酵母エキス発酵 (実施例1) 間に発酵培地試料を得、アミノ酸分析に付した。特に、株BST-1での低酵母エキス発酵から得られた試料を用いた。これらの発酵からのスペント (spent) 培地試料は、ノルロイシンの一時的合成および蓄積を示した。接種20時間後に得た培地試料は検出可能なノルロイシンをほとんど含有しておらず (9.02分溶出時間)、一方、発酵中6時間後に調査した試料はアミノ酸クロマトグラフでノルロイシンのピーク (0.15mM) を明らかに示した。該ノルロイシンのピークは接種後30および32時間後に得られた試料で増加し続け、0.47mMの終濃度に達した。

収集したデータは、株BST-1での低酵母エキス発酵間のノルロイシンの生産についての時間経過を示す。ノルロイシンの合成および分泌は接種後10ないし15時間に開始し、発酵の最後まで継続し、0.60mMの終濃度に到達した。株BST-1で行い、長時間行った1のrbSt発酵の間に、ノルロイシンの濃度は接種66.2時間後までに2.47mMに達した。従って、本発明者らは、低酵母エキス発酵の間に、イー・コリ培養によってノルロイシンがde novo合成されたことを証明した。これらの結果は、第2のコー・コリ株でも確認された。

株BST-1での低酵母エキス発酵間のこれらの2種のアミノ酸間の関係を理解するために、入手可能なメチオニンおよびノルロイシンの濃度を調べた。データは、酵母エキス補足によって供給されたメチオニンの濃度は典型的には<0.1mMであり、メチオニンは接種後15時間までに発酵培地から枯渇したことを示した。発酵におけるかかる見地より、培養代謝および増殖、ならびにrbSt合成に要するすべてのメチオニンは培養によって合成された。メチオニンの枯渇に付随して、発酵培地における過剰ノルロイシンの合成および蓄積が観察された。これらのデータは、BST-1培養によるノルロイシンのde novo合成速度はノルロイシン利用 (例えば、蛋白合成) の速度よりもかなり大きかったことを示す。

実施例3 低酵母エキス発酵間の外因性アミノ酸での補

足

本実施例では、本発明者らは、細胞質アミノ酸プールにおけるノルロイシンおよび他のアミノ酸類の濃度を変更し、ノルロイシンのrbStへの取り込みについての得られた効果を観察した。

rbStの公知アミノ酸組成、イー・コリ増殖（ジェイ・エル・イングラハムら（J.L.Ingraham et al）、細菌細胞の増殖（Growth of the Bacterial Cell）、108-10および122-25頁（1983））についてのアミノ酸要求

（乾燥重量当たりのグラム）の見積り、およびディフコ（Difco）カザミノ酸の実験的に決定したアミノ酸組成より、本発明者らは、細胞増殖およびrbSt合成に要するすべてのアミノ酸を供給するには、3%カザミノ酸および6mMグリシンを低酵母エキス発酵（実施例1）に添加すべきことを見積もった。メチオニンに関しては、この付加補足は、細胞増殖およびrbSt合成についてのアミノ酸要求の見積りもりの125%と計算された。さらに3%カザミノ酸および6mMグリシンを補足した低酵母エキス発酵を行った場合、N-末端アミノ酸配列決定法によると、rbStのN-末端にノルロイシンは検出されず、痕跡量（0.3モル%）のノルロイシンが5位に検出されたに過ぎなかった。対照的に、非補足（カザミノ酸無し）低酵母エキス対照発酵間に生産されたrbStはN-末端に2.8モル%ノルロイシンおよび5位に15.3モル%ノルロイシンを含有していた。付加カザミノ酸補足におけるアミノ酸はノルロイシンのrbStへの取り込みを妨げる。これらのデータは、含ノルロイシンrbSt（LE-rbSt）は高濃度酵母エキス（例えば、5%酵母エキス）を含有する発酵では生産されなかったという観察に一致する。

実施例4 低酵母エキス発酵間の外因性L-メチオニンでの補足

次に、本発明者らは、低酵母エキス発酵の5mM L-メチオニンでの補足を調べた。非補足低酵母エキス発酵間に株BST-1によって生産されたrbStのN-末端アミノ酸配列決定は、各々N-末端および5位において2.1および22.1モル%ノルロイシンを示した（第3表）。低酵母エキス発酵培地の8mM D,L-ノルロイシンでの補足は、さらに、N-末端および5位で検出されるノルロイシンのレベルを増加させた（第3表）。ノルロイシン補足はrbStにおけるノルロイシン含有量を増強させる効果的手段を示した。

5mM L-メチオニンでの補足は、rbSt5位におけるノルロイシンの取り込みを完全に排除し、一方、痕跡量の（0.2モル%）ノルロイシンがN-末端で検出されたに過ぎない。rbStのN-末端における痕跡量のノルロイシンの検出は、発酵の後期段階での、メチオニン制限のため、ホルミル-L-メチオニンの利用可能性が減少したことに起因するであろう。メチオニン濃度 $\geq 5\text{mM}$ で行った他の発酵はrbStのN-末端および5位いずれでもノルロイシンを示さなかった。さらに、1.25mMと低い濃度のL-

メチオニンを用いるタイトレーション実験は、rbStへのノルロイシンの取り込みは5位において < 1 モル%ノルロイシンまで減少されることを示した。

実施例5 低酵母エキス発酵間のメチオニンの他の源での補足

本実施例は、低酵母エキス発酵（実施例1）が行い得ること、およびノルロイシンのrbStへの取り込みがL-メチオニンよりも安価なメチオニン源での補足によって妨げられることを示す。

5mM D,L-メチオニンを使用する最初の発酵（シンテックス・アグリ・ビジネス・インコーポレイテッド（Syntex Agri Business, Inc.）、スプリングフィールド（Springfield）、ミズリー州）を行い、N-末端または5位いずれでもノルロイシンが検出されないごとく、ノルロイシンのrbStへの取り込みを防止するのに効果的であることが判明した。従って、食品または飼料グレードのD,L-メチオニン（デグサ・コーポレーション（Degussa Corp.）、テオドレ（Theodore）、アラバマ州）を濃度5mMで用いて株BST-1での低酵母エキス発酵を補足した。第4表のデータは、これらの2種グレードのD,L-メチオニンがノルロイシンのrbStへの取り込みを妨げたことを示す。食品グレードのD,L-メチオニンはノルロイシンの取り込みを完全に妨げ、一方、飼料グレードのD,L-メチオニンで補足して発酵間に生産されたrbStの5位においてはわずかな痕跡量のノルロイシン（0.1モル%）が見いだされたに過ぎず、これは恐らく後者においては2.5mM L-メチオニン成分の消費によるものである（第4表）。引き続いての実験において、 $\geq 5\text{mM}$ 飼料グレードのD,L-メチオニンでの補足はノルロイシンのrbStへの取り込みを完全に妨げた。高レベルの酵母エキス、カザミノ酸類、D,L-メチオニンまたはL-メチオニンいずれかを介するメチオニン補足はノルロイシンのrbStへの取り込みを排除した。

実施例6 株BST-1によるメチオニンおよびノルロイシン生合成への影響

メチオニン補足がノルロイシン生合成に与える影響を調べるために、メチオニンを補足してまたは補足せずに行った発酵の間の株BST-1によるノルロイシンの合成および分泌をモニターした。データは、メチオニン補足はノルロイシンの合成を妨げなかったことを示す。むしろ、メチオニン補足は調べた各例についてノルロイシン生合成の特異的活性を減少させた（ミリモル・ノルロイシン/1・時・Asso）。事実、ノルロイシンは、メチオニン補足なくして行った低酵母エキス発酵の最後までに終濃度0.60mMまで、およびメチオニン補足での同時発酵の最後までに0.57mMまで蓄積した。平均酸素摂取量（OUR）および二酸化炭素発生（CER）速度がメチオニン補足なくして観察されたものよりも53%および58%高いごとく、メチオニン補足は細胞の代謝を変化させ、培養増殖を促進した。培養乾燥細胞重量収率および最終濁度もメ

チオニン補足では高かった（各々、24%および38%）。実施例7 rbSt合成とノルロイシンの生合成および分泌との間の関係

株BST-1での低酵母エキスを発酵の間に培養の一部を得、アミノ酸を分析し、合計rbStを定量した。データは、接種15時間後までに、培地中のメチオニン濃度は0.05から0.00mMに減少したことを示す。接種15時間後まもなく、ノルロイシン生合成が開始し、接種後40時間までに終濃度0.86mMに達した。rbSt合成の自然誘導はノルロイシンの生合成および分泌が開始したのと同時点で起こった。これらのデータは、イー・コリ培養によるrbStの合成および蓄積はノルロイシンの生合成を媒介する原因かも知れないことを示唆し、そこで、本発明者らはこれをテストした。

BST-1培養によるrbStの生産はプラスミドランナウェイ複製の自然誘導に従う。従って、本発明者らは、ランナウェイプラスミド複製およびrbSt合成（BST-1）双方が可能な培養、rbSt合成なくしてプラスミドランナウェイ複製が可能な培養（pURA4（米国特許出願016294号）に由来するものであってランナウェイ複製が可能であるが、rbSt遺伝子のほとんどの850bp EcoRI/HindIII欠失のためrbStを合成できないプラスミドpURA4 Δ bghE_{II}）を含有するBST-1C）、およびランナウェイプラスミド複製もrbSt合成も有しない培養（株BST-1C、ランナウェイプラスミド複製およびrbSt合成から独立して増殖する株BST-1の同系プラスミドフリー誘導体）によってノルロイシン生合成を調べた。第5表のデータは、株BST-1CおよびBST-1C（pURA4 Δ bghE_{II}）はBST-1よりも2.2ないし2.5倍大きな密度（乾燥重量）まで増殖したことを示す。また、これらのデータは、株BST-1CおよびBST-1C（pURA4 Δ bghE_{II}）はそれらの低酵母エキスを発酵の間に実質的に等量のノルロイシン（約0.01ミリモルノルロイシン/g乾燥細胞重量）を合成したことを示す。しかしながら、株BST-1は調べた他の株いずれよりもかなり多いノルロイシン（約14倍高い）を合成し、平均濃度0.14ミリモルノルロイシン/g乾燥細胞重量に達した（第5表）。本発明者らは、両プラスミド担持株がランナウェイプラスミド複製を有することも確認した。

まとめると、これらのデータは、イー・コリによるノルロイシン生合成は低酵母エキスを発酵の間にrbSt合成に関与したことを示す。プラスミドランナウェイ複製の現象とは無関係に、感知されるノルロイシンの蓄積はrbSt合成無くしては観察されなかった。幾分不十分ではあるが、ノルロイシンは異種ポリペプチド類を発現していなかった低酵母エキスを発酵の間にイー・コリ株によってノルロイシンが生産された。

実施例8 蛋白合成間のノルロイシン取り込みを排除するためのロイシン補足

本実施例では、本発明者らは、低酵母エキスを補足および生合成における外因性ロイシンおよび他のアミノ酸と

ノルロイシンのrbStへの取り込みとの間の関係を調べた。

発酵培地試料のアミノ酸分析により、実質的にすべての外因性ロイシンが、ノルロイシンの生合成および分泌が開始する時点にほぼ対応する発酵間での時点である接種後14時間までに枯渇した（最初0.17mMが0.03mMまで減少）ことが明らかとされた。

さらに発酵を行って、ロイシン補足がノルロイシンの生合成および分泌、ならびにノルロイシンのrbStへの取り込みに与える影響を直接に調べた。データは、低酵母エキスを発酵のロイシン補足がなければ、ノルロイシンの生合成および分泌は接種後約15時間に開始し、接種後40時間までに終濃度0.86mMに達したことを示した。第2発酵の15mM L-ロイシンでの補足の結果、ノルロイシンの生合成および分泌の完全な抑制が生じた。外因性ロイシンによる α -イソプロピルマレートシンターゼのフィードバック抑制は、ノルロイシン生合成に至る経路における最初の反応を阻止することによってノルロイシン生合成を妨げた。データは、ロイシン補足培養の増殖は接種後最初の19時間は非補足培養のものと区別できないことを示した。その時点の後、ロイシン補足培養の増殖が停止し始め、非補足培養についての24.4Asoと比べて11.4Asoの終密度に達した。ロイシン補足および非補足培養によるrbStの生産についてのデータを比較すると、ロイシン補足培養によるrbSt生産は接種後20時間に減衰し始めた。ロイシン補足および非補足培養についてのrbSt合成の初期速度は非常に似ており（各々、K=0.66および0.78/時間）、ロイシン補足による初期の乱れを示さない。これらの発酵から得た発酵培地の飼料のアミノ酸分析により、ロイシン補足培養によってノルロイシンは合成されず、一方、ノルロイシン終濃度は非補足培養では0.60mMに達したことが確認された。

非補足および15mM L-ロイシン-補足発酵から得たrbSt試料のN-末端アミノ酸配列決定により、非補足発酵からのrbStのN-末端および5位における1.3および22.0モル%ノルロイシンが示され、一方、L-ロイシン-補足発酵から得たrbStについてはいずれの位置にもノルロイシンは検出されなかった（第6表）。

実施例9 ノルロイシンのrbStへの取り込みに与えるL-システイン補足の影響

5または15mM L-システインで補足したまたは補足しない発酵を行った。当該補足がノルロイシンの生合成を低減させ、およびrbStへのその取り込みを減少させ得るかを否かを決定するために、ノルロイシンの生合成および分泌ならびにノルロイシンのrbStへの取り込みをモニターした。第7表のデータは、外因性システインを補足した場合でも、株BST-1によってノルロイシンがいくらか合成されたことを示す。15mM L-システインで補足した発酵の間に細胞外培地で検出されたノルロイシン濃度のわずかな減少は高システインレベルでの増殖の乱れ

のためであるようだった。15mM L-システイン補足培養についての平均最終培養吸光度 (Asso)、合計乾燥重量、およびrbSt収率は、非補足発酵からの培養から得た各レベルの51%、48%、および45%であった。5mM L-システインでの補足は、非補足発酵と比較して、培養の増殖を変更することは感知されず、ノルロイシン量の減少は検出されなかった (第7表)。しかしながら、5mM L-システインでの補足は、rbstのN-末端および5位で検出されたノルロイシン量を、各々、1.7および21.8モル%から1.6および18.9モル%に減少させた (第7表)。さらに、15mM L-システインでの補足はN-末端および5位におけるノルロイシンの濃度を、各々、1.1モル%および13.8モル%まで減少させた。

また、株BST-1C (pURA4C-S) で発酵を行った。プラスミドpURA4C-Sは、rbStの各4個の内部システイン残基をセリン残基で置き換え、部位定方向化 (site-directed) 突然変異誘発によってpURA4から得た。この株によるrbStの合成は、rbSt合成についてのde novo合成されたシステインに対しいずれの要求もなくして進行した。株BST-1 (pURA4C-S) での非補足低酵母エキス発酵の最後までに、ノルロイシンは0.43mMの細胞外濃度まで蓄積した。さらに、N-末端アミノ酸配列決定により、rbStのN-末端および5位において、各々、0.9および17.7モル%であることが明らかとされた。

システイン補足およびシステインを欠くrbStの合成いづれもノルロイシンの合成に大きく影響することはなかったが、それらはメチオニンのレベルをわずかに上昇させた。メチオニンの利用可能性の増大の結果、tRNA^{Met}およびtRNA^{Phe}の正しいチャージングについてのノルロイシンとのより効果的な競合が生じた。さらに、メチオニン生合成の増大の結果はノルロイシンのrbStへの取り込みの量依存性減少であった。

実施例10 それにより発現された異種ポリペプチド類へのノルロイシンの取り込みを排除するためのメチオニンを過剰生産する突然変異体微生物の使用

ポリペプチド類を発現する宿主としてメチオニンを過剰生産する微生物を用いることによって、ノルロイシンの異種ポリペプチド類への取り込みを排除することもできる。かかる突然変異体はフィードバック-非感受性ホモセリントランススクシニラーゼ (metA) 突然変異体類、またはメチオニンについて抑制された突然変異体類 (metJまたはmetK突然変異体)、あるいは双方を包含する (アール・ジェイ・ロウベリ (R.J.Rowbury): アミノ酸生合成および遺伝子調節 (Amino Acids Biosynthesis and Genetic Regulation)、ケイ・エム・ハーマンおよびアール・エル・ソメルビル (K.M.Herrman and R.L.Somerville) 編、191-211頁 (1983))。メチオニン-原栄養生物を75-90%殺傷の結果となるに十分な用量にて紫外線照射または化学突然変異誘発物質 (例えば、メチルメタンサルホネートのまたは1-メチル-3

-ニトロ-1-ニトロソグアニジン) に暴露し、 α -メチルメチオニン、オチオニン、またはノルロイシンで補足したはっきりとした培地の平板に希釈物を接種する。ミクロシン15、93または136に対する耐性についての選択を使用する別法アプローチを用いてメチオニン過剰生産者を得ることもできる (エフ・バケロラ (F.Baquero, et al)、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J.Bacteriol.)、135,342-347頁 (1978))。metA、metJ、およびmetK突然変異体を得るさらなる別法は、標準的な形質導入アプローチ (ジェイ・エイチ・ミラー (J.H.Miller)、分子遺伝学における実験 (Experiments in Molecular Genetics)、201-205頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリーズ (Cold Spring Harbor Laboratories) (1971)) による、公知突然変異体メチオニン対立遺伝子 (例えば、metA::Tn10等、イー・コリ遺伝子ストックセンター、エール大学、c/oビイ・ジェイ・バックマン (B.J.Bachmann) より入手可能) の導入を包含する。いずれかのプロトコルから、指標生物として非逆転メチオニン要求菌で接種した頂部寒天を、メチオニンフリーのはっきりとした培地の平板上で予め増殖させた推定クローン類のコロニーに重ねることによって、交差育種 (crossfeeding) 実験においてメチオニン過剰生産 (および分泌) について当該クローンをテストする。インキュベーションに続き、メチオニン要求株の増殖を、メチオニンを過剰生産しそれを分泌するコロニー上または周囲で観察する。前記実施例に記載したとき定量的アミノ酸分析の方法によって、(乾燥重量1g当たりの) 全細胞メチオニン含量および細胞外環境 (細胞フリーのスペント (spent) 培地) 中のメチオニン含量の定量をはっきりとした液体培地中での増殖により達成する。公知技術による異種遺伝子で形質転換したメチオニン過剰生産株で行った (メチオニン補足なしの) 低酵母エキス発酵の結果、ノルロイシンの異種ポリペプチド類への取り込みが阻止される。

実施例11 メチオニンに代えて置き換えたノルロイシンを含有するrbStの酸化安定性の増加

蛋白を3% H₂O₂に暴露し、続いて逆相HPLC (RP-HPLC) で分析することにより、メチオニンがノルロイシンによって置き換えられているrbStの対酸化安定性の増加を測定した。H₂O₂への暴露に際し、天然rbSt (ノルロイシンフリー) は、RP-HPLCによると2つのより初期の溶出位置にシフトした。第1の位置シフトは非常に急速に起こり (半減期約1.2分)、分子のサイトAにおける修飾のため、修飾rbSt分子をして、既にH₂O₂に暴露されたrbStよりわずかに速く溶出せしめた。第2の位置シフトはよりゆっくりと起こり (半減期約14.3分)、その結果、分子のサイトBにおける修飾のため、より大きいRP-HPLCシフトとなった (サイトAおよびBは、天然rbSt分子に存在する4個のメチオニン残基を表すために任意に名付けたものである)。

各々メチオニンおよびノルロイシン補足発酵から得られた天然rbSt (メチオニンフリー) およびノルロイシン置換 (rbSt位5、124、149および179において約36%ノルロイシン) rbStを、室温で、2mg rbSt/mlにて、5mM (NH₄)₂CO₃、pH10.0中の3% H₂O₂に暴露した。暴露に続き、該H₂O₂を同緩衝液中で平衡化したファルマシア (Pharmacia) PD-10 G-25カラム上のゲル濾過によって除去した。次いで、試料をRP-HPLCによって分析した。40分の暴露の後、天然rbStは、各々、サイトAおよびBの100%および85.6%修飾を呈し、一方、ノルロイシン置換rbStはこれらのサイトの47.6%および51.4%修飾を含有するに過ぎなかった。従って、ノルロイシンによるメチオニンの置換は、RP-HPLC挙動によって決定されたごとく、rbSt分子に対する酸化安定性の増大に寄与した。

実施例12 ノルロイシンの取り込みを阻止するためのrbSt遺伝子におけるメチオニン・コドンの置換

天然rbSt遺伝子についてのメッセンジャーRNA転写体の翻訳の結果、5位におけるメッセンジャー残基の取り込みが起こる。rbStにおけるメッセンジャー残基によって通常占められる他の位置に関しては、位置5をノルロイシン残基によって置き換えることができる。従って、メチオニン・コドンのメチオニン以外のアミノ酸についてのコドンでの置換はrbStへのノルロイシン取り込みを阻止するであろう。

当業者によく知られた技術 (1989年1月19日出願のU.S.S.N.07/299,107) に従う合成オリゴヌクレオチドの組み込みによって、rbStをコード付けする遺伝子における5位のメチオニン・コドンATGをイソロイシンをコード付けるATCに変化させ、その結果、rbst₀と命名した構築体を得た。250リットル規模での低酵母エキス培地中での攪拌タンク発酵の間、この遺伝子を有するベクターを持つベクターを担持するイー・コリ宿主の増殖およびそれによるtbSt合成をモニターした。発酵培地試料を発酵の間に得て、アミノ酸分析に付した。加えて、rbStを単離し、N-末端アミノ酸配列決定に付して5位に見い出されるアミノ酸残基を定量した。発酵の間にノルロイシンが生産され、発酵の最後までに細胞外に0.36mMの終濃度まで蓄積された。m₀遺伝子によってコード付けされるrbStのN-末端アミノ酸配列決定により、イソロイシンのみが5位に存在し、ノルロイシンまたはメチオニンは存在しないことが明らかとされた。

同様に、rbSt分子における他の位置のメチオニン・コドンの置換はノルロイシンのrbStへの取り込みを阻止するであろう。X線結晶分析は、メチオニン残基5位がはっきりとした2次構造をほとんど持たないrbStの部分に存在し、残基124および179はアルファ・ヘリックスに存在し、149は、β巻とほとんど同様に、鎖逆転の領域に存在することを示す (エス・エス・アブデル・メギドラ (S.S.Abdel-Meguid, et al)、プロシーディングズ・

オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.Natl.Acad.Sci.) USA, 84, 6434-37頁 (1987))。チョウおよびファスマン (Chou and Fasman) の予測パラメーターは残基5、124および179周囲の2次構造を正しく予測するが、残基179はβ-プリーツシート領域に存在すると誤って示唆する (ピー・ワイ・チョウおよびジ・デイ・ファスマン (P.Y.Chou and G.D.Fasman)、アヌ・レブ・バイオケム (Ann.Rev.Biochem.), 47, 251-76 (1978); シー・ジェイ・エイチ・シェンおよびエム・ソネンブルグ (C.J.H.Chen and M.Sonnenburg)、バイオケミストリー (Biochem.), 16, 2110-18頁 (1977))。

ウシ (エル・グラフおよびシー・エイチ・リィ (L.Graf and C.H.Li)、バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem.Biophys.Res.Comm.), 56, 168-76頁 (1974))、ブタ (ピー・エイチ・シーベルグら (P.H.Seeberg, et al)、デイ・エヌ・エイ (DNA), 2, 37-45頁 (1983))、ヒツジ (シー・エイチ・リィら (C.H.Li, et al)、イント・ジェイ・ペプ・プロ・レス (Int.J.Pep.Pro.Res.), 4, 151-53頁 (1972))、ウマ (エム・エム・ザキンら (Zakin, et al)、イント・ジェイ・ペプ・プロ・レス (Int.J.Pep.Pro.Res.), 8, 435-44頁 (1976))、ラット (ジ・エス・ページら (G.S.Page, et al)、ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucl.Acids Res.), 9, 2087-2104頁 (1981))、ヒト (エフ・エム・デノトラ (F.M.DeNoto, et al)、ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucl.Acids Res.), 9, 3719-30頁 (198))、サル (シー・エイチ・リィら (C.H.Li, et al)、アーカイブズ・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイフィジクス (Arch.Biochem.Biophys.), 245, 287-91頁 (1986))、およびニワトリ (エル・エム・スーザら (L.M.Souza, et al)、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・ズーロジー (J.Exp.Zool.), 232, 465-73頁 (1983))。ソマトトロピン類のアミノ酸配列の分析は、bSt, pSt, oSt, eSt, ラットStおよびニワトリStにおける5位のメチオニンはヒトおよびサル・ソマトトロピンにおけるイソロイシンであることを示す。ニジマス (エル・ビー・アゲロンおよびティ・ティ・ヘン (L.B.Agellon and T.T.Chen)、デイ・エヌ・エイ (DNA), 5, 463-71頁 (1986)) およびサケ (エス・セキンら (S.Sekine, et al)、欧州特許出願85107987.1号) のアミノ酸配列は哺乳動物およびニワトリStからかなり発散しており、これらの配列の配置はこの領域では困難である。

124位におけるメチオニンは7種の哺乳動物およびニワトリ・ソマトトロピン類で不変である。

ウシ、ヒツジ、およびラットStにおける149位のメチオニンはブタ、ウマ、およびニワトリStにおけるロイシンおよびヒトおよびサルStにおけるセリンである。ニジマスおよびサケStにおける対応アミノ酸はほとんどロイ

シンのようである。ヒトおよびサルStの残基147~149についてのスレオニン-アスパラギン-セリンのアミノ酸配列は、イソアスパラギン酸の形成および鎖切断がそこで起こるbStおよびpStの98~100と同一であるので、メチオニン149をセリンに変化させると同一タイプの切断に至り得る。

bSt、pSt、oSt、ラットStおよびニワトリStにおける179位のメチオニンはヒトおよびサルStにおけるバリン、およびニジマスおよびサケStにおけるアラニンである。

哺乳動物およびニワトリ・ソマトトロピンのアミノ酸配列において、bStにおいてメチオニン以外のアミノ酸が生じ、メチオニンがもう1つの種からのStで見い出されるさらに4つの位置がある。bSt、pSt、oSt、eSt、ラットStおよびニワトリStにおける15位のバリンはヒトおよびサル・ソマトトロピンにおけるメチオニンである。bSt、oSt、hSt、およびサルStにおける73位のロイシンはpStにおけるバリンおよびウマ、ラット、およびニワトリStにおけるメチオニンである。bSt、pSt、oSt、St、hSt、サルおよびニワトリStにおける102位のバリンはラットStにおけるメチオニンである。最後に、bSt、pSt、oSt、eSt、ラットおよびニワトリStにおける169位のロイシンはヒトおよびサルStにおけるメチオニンである。

哺乳動物およびニワトリ・ソマトトロピンにおける非メチオニン/メチオニン置換の中では、16例(例=位置数+その位置におけるバリンを持つ種の数)において、バリンが4位におけるメチオニンを置き換え、ロイシンおよびメチオニンは3位および13例で相互交換可能であり、イソロイシンは1位および2例でメチオニンを置き換える。

前記のことを考慮すると、bStにおける4個の含メチオニン部位が独立と考えられると、5位についての好ましい変化は前記したごとくイソロイシンへのものであり、124位における不変メチオニンについてもやはりそうである。バリンもまた好ましい。149位についてはロイシンが好ましい。179位についてはバリンが好ましい。

bStにおけるすべての4個のメチオニン残基が単一の同一アミノ酸に変化する場合、選択は1)ロイシン、2)バリン、または3)イソロイシンである。

同様の分析により、他の異種ポリペプチド類におけるメチオニンに代えての他の適当なアミノ酸置換も当業者ならば選択できる。

実施例13 ロイシン、イソロイシン、およびバリンでの補足が組換え体ウシ・ソマトトロピンを生産するための発酵に与える影響

L-ロイシンでの低酵母エキスイ発酵の補足は株BST-1によるノルロイシンの合成を完全に抑制した。加えて、かかる発酵により、N-末端アミノ酸配列決定に付した場合に、rbSt分子の5位にノルロイシンを含有しな

いrbStを生じた。しかしながら、低酵母エキスイ発酵のL-ロイシンでの補足は、単独で、培養増殖を乱し、rbSt生産量を低下させた。

L-ロイシン補足により媒介される可能性のある培養増殖がイソロイシンおよび/またはバリンのde novo合成に与えるいずれの抑制をも解消するために、L-ロイシン、L-イソロイシン、およびL-バリンでの補足を用いて発酵を行った。各3種のアミノ酸での補足は、L-ロイシンのみで補足した平行発酵と比較して大いに培養増殖を促進させた(各々、44.9および12.9Asoの培養密度)。加えて、ロイシン、イソロイシン、およびバリンでの補足の結果、ロイシン-補足発酵からの単に0.43グラムrbSt/リットルと比較して、1.97グラムrbSt/リットルの最終rbSt力価となった。N-末端アミノ酸配列決定データにより、いずれの低酵母エキスイ発酵から得たrbStについても5位にノルロイシンが存在しないことを明らかにとされた。さらに、定量的アミノ酸分析により、いずれの発酵についての発酵培地試料にもノルロイシンは検出されなかった。まとめると、これらのデータは、rbStの生産についての低酵母エキスイ発酵のL-ロイシン補足はノルロイシンのde novo合成およびrbSt分子へのその取り込みを抑制するという観察を支持する。

第 1 表

接種に先立って得た、および
BST-1発酵の間のrbSt合成の
自然誘導時に得た発酵培地試
料におけるアミノ酸濃度^a

アミノ酸	アミノ酸濃度(mM) ^b	
	最初	誘導時
アラニン	0.35	0.04
アルギニン	0.07	0.00
アスパラギン	0.06	0.00
アスパラギン酸	0.10	0.00
システイン	nd ^c	nd
グルタミン	0.16	0.03
グルタミン酸	0.16	0.03
グリシン	0.13	0.00
ヒスチジン	0.04	0.00
イソロイシン	0.23	0.00
ロイシン	0.38	0.03
リジン	0.03	0.02
メチオニン	0.07	0.00
フェニルアラニン	0.19	0.00
プロリン	0.16	0.03
セリン	0.13	0.00
スレオニン	0.13	0.00
トリプトファン	0.05	0.00

アミノ酸	アミノ酸濃度(mM) ^b	
	最初	誘導時
チロシン	0.06	0.03
バリン	0.28	0.03

- a 接種約15時間後に自然に誘導されたrbSt合成
- b 0.1%(重量/容量)酵母エキスでの補足によって発酵培地を調製した。示されたグルタミンおよびグルタミン酸濃度は定量されたグルタミン+グルタミン酸(Glx)の50%である。
- c 測定せず

第 2 表

ノルロイシンの合成および分泌
と非補足低酵母エキス発酵の間
に合成されたrbStへのノルロイ
シンの取り込みとの間の関係

時間(接種後) ^a	ノルロイシン取 込(モル%)		ノルロイシン濃度 (mM)
	N-末端	5位	
19.0	0.0	2.6	0.0
25.0	1.4	18.3	0.1
33.5	2.0	24.9	0.6

- a rbSt合成の自然誘発は接種後約15時間に起こった。

第 3 表

株BST-1での発酵の間の、D,L-
ノルロイシンまたはL-メチオ
ニンでの補足がrbStのN-末端
および5位におけるノルロイ
シンの取り込みに与える影響

培地補足 ^b	ノルロイシン取り込 み(モル%)	
	N-末端	5位
非補足	2.1	22.1
8mM D,L-ノルロイシン	4.4	34.3
5mM L-メチオニン	0.2	0.0

- a 接種後30時間に収穫した発酵試料
- b 前記で示した補足に加えてすべての培地を0.1%酵母エキスで補足した。

第 4 表

株 B S T - 1 での発酵の間の、飼料および食品グレードの D, L
 -メチオニンでの補足が r b S t の N - 末端および 5 位におけるノ
 ルロイシンの取り込みに与える影響^a

培地 ^b	ノルロイシン取り込み (モル%)	
	N - 末端	5 位
補足 ^c		
非補足	2.04	24.91
5 mM L - メチオニン	0.00	0.00
5 mM D, L - メチオニン	0.00	0.07
飼料グレード ^c		
5 mM D, L - メチオニン	0.00	0.00
食品グレード		

^a接種後 31 時間に収穫した発酵試料 ^b前記で示した補足に加え
 てすべての培地に 0.1% 酵母エキスを補足した。

^cD, L - メチオニンの飼料および食品グレード源はデグサ・コ
 ーポレーション (Degussa Corp) から得た。

第 5 表
ノルロイシン生合成および
分泌と株BST-1によるrbSt
の合成との間の関係

株	プラスミド	乾燥重量 (g/リッ トル)	ノルロ イシン 濃度 (mM)	ノルロイ シン濃度 (mM/g乾 燥重量)
BST-1	pURA4	5.4	0.73	0.14
BST-1C	無し	13.3	0.09	0.01
BST-1C	pURA4 Δ bgh _{8/8}	11.7	0.12	0.01

a 発酵は各々二連で行い、データは平均値として示す。発酵培地は0.1%酵母エキスを補足した。

第 6 表
株BST-1での発酵の間の、L-ロ
イシン補足がrbStのN-末端お
よび5位におけるノルロイシ
ンの取り込みに与える影響

培地補足 ^b	ノルロイシン取り込み (モル%)	
	N-末端	5位
非補足	1.3	22.0
15mM L-ロイシン	0.0	0.0

a 各々、非補足およびロイシン-補足発酵につ

いての、接種後40および46時間に収穫した発酵
試料

b 前記で示した補足に加えて、発酵培地には
0.1%酵母エキスを補足した。

第 7 表
L-システイン補足がノルロ
イシンの生合成および分泌
とノルロイシンのrbStへの
ノルロイシンの取り込みに
与える影響

培地補足 ^b	ノルロイシ ン濃度(mM)	ノルロイシン取 り込み(モル%)	
		N-末端	5位
非補足	0.73	1.7	21.8
5mM L-システイン	1.18	1.6	18.9
15mM L-システイン	0.59	1.1	13.8

a 発酵試料は接種後40時間に収穫した。

b 前記で示した補足に加えて発酵培地に0.1%
酵母エキスを補足した。

チャート1. ウシ・ソマトトロピンのアミノ酸配列

1
 ala phe pro ala met ser leu ser gly leu phe ala asn ala val
 20
 leu arg ala gln his leu his gln leu ala ala asp thr phe lys
 40
 glu phe glu arg thr tyr ile pro glu gly gln arg tyr ser ile
 60
 gln asn thr gln val ala phe cys phe ser glu thr ile pro ala
 pro thr gly lys asn glu ala gln gln lys ser asp leu glu leu
 80
 leu arg ile ser leu leu leu ile gln ser trp leu gly pro leu
 100
 gln phe leu ser arg val phe thr ~~asn~~ ser leu val phe gly thr
 120
 ser asp arg val tyr glu lys leu lys asp leu glu glu gly ile
 leu ala leu met arg glu leu glu asp gly thr pro arg ala gly
 140
 gln ile leu lys gln thr tyr asp lys phe asp thr asn met arg
 160
 ser asp asp ala leu leu lys asn tyr gly leu leu ser cys phe
 180
 arg lys asp leu his lys thr glu thr tyr leu arg val met lys
 190
 cys arg arg phe gly glu ala ser cys ala phe

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 N 1/21

(C 1 2 P 13/06

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

識別記号

F I

C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

- (72)発明者 キルシュナー, リチャード・ジェイ
アメリカ合衆国ミシガン州49001、カラ
マズー、サウス・パーク・ストリート
2334番
- (72)発明者 ピナー, ジェイムズ・エフ
アメリカ合衆国ミシガン州49002、ポー
テイジ、セント・アンソニー3170番
- (72)発明者 ガーリック, ロバート・エル
アメリカ合衆国ミシガン州49012、オー
ガスタ、ノース・フォーティーサード・
ストリート10050番

(56)参考文献 J a u r n a l o f M o l e c u
l a r B i o l o g y, V o l. 133,
p. 217-231 (1979)

相田浩著「応用微生物学」(昭42-3
-31) 東京同文書院、第56-58頁

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)

C12N 15/18, 1/19, 1/21

C07K 14/61

C12P 13/06, 21/02

CA (STN)

REGISTRY (STN)